

10/552000

JC05 Rec'd PCT/PTO 04 OCT 2005

Written Amendment

(Amendment under Article 11 of Patent Law)

To: NANAJO Satomi,

Examiner of the Patent Office

5 1. Designation of the International Application

PCT/JP2004/005071

2. Applicant

Name: YANAGI Hiroko

Address: Ambient Kokura 912, 16-1, Kumamoto 3-chome

10 Kokurakita-ku, Kitakyusyu-shi, Fukuoka

802-0044 JAPAN

Nationality: Japan

Residence: Japan

3. Agent

15 Name: NARUSE katsuo

Patent Attorney (8273)

Address: 5th Floor, TKK Nishishinbashi Bldg., 11-5,

Nishishinbashi 2-chome, Minato-ku, Tokyo

105-0003 Japan

20 4. Subject to be amended: Description

5. Contents of Amendment

(1) The statement "The thus obtained tissue is fed into an injection syringe or the like and, after attaching a needle, injected into a defect in a cartilage to thereby treat or repair nasal deformation, nose elevation,

facial bone deformation, facial bone defect,  
gnathoplasty, skull deformation, skull defect,  
arthrosis deformans, microtia and other diseases  
accompanied by a defect in a cartilage and a defective  
5 cartilage." (description, page 6, lines 6 to 9), is  
amended as follows by deleting the term "arthrosis  
deformans", "The thus obtained tissue is fed into an  
injection syringe or the like and, after attaching a  
needle, injected into a defect in a cartilage to thereby  
10 treat or repair nasal deformation, nose elevation,  
facial bone deformation, facial bone defect,  
gnathoplasty, skull deformation, skull defect,  
microtia and other diseases accompanied by a defect in  
a cartilage and a defective cartilage."

15 (2) The statement "The method of producing chondrocytes  
according to the present invention can be applied to  
the culture of chondrocytes of any human cartilage  
tissue having perichondrium bonded thereto such as  
auricular cartilage, costal cartilage, articular  
20 cartilage, intervertebral cartilage or tracheal  
cartilage. In particular, it is suitable for culturing  
and proliferating chondrocytes of auricular  
cartilage." (description, page 6, lines 19 to 22) is  
amended as follows by deleting the term "articular  
25 cartilage", "The method of producing chondrocytes

according to the present invention can be applied to  
the culture of chondrocytes of any human cartilage  
tissue having perichondrium bonded thereto such as  
auricular cartilage, costal cartilage, intervertebral  
5                   cartilage or tracheal cartilage. In particular, it is  
suitable for culturing and proliferating chondrocytes  
of auricular cartilage."

10                 (3) The statement "The thus treated tissue is centrifuged  
and the obtained precipitate is employed in the  
culture." (description, page 7, line 10) is amended as  
"The thus treated tissue is centrifuged and the obtained  
precipitate (chondrocytes and perichondrium cells) is  
employed in the culture.

15                 6. List of Attached Documents

- (1) Description page 6
- (2) Description page 7

OVER

it is possible to obtain a tissue which has a high mechanical strength and therefore is durable handling with instruments such as tweezers and never undergoes dispersion or absorption *in vivo* after transplantation. Although the number of multilayer seedings varies depending on the size of a desired tissue, it is generally preferable to carry out the multilayer seeding three or four times.

The thus obtained tissue is fed into an injection syringe or the like and, after attaching a needle, injected into a defect in a cartilage to thereby treat or repair nasal deformation, nose elevation, facial bone deformation, facial bone defect, gnathoplasty, skull deformation, skull defect, microtia and other diseases accompanied by a defect in a cartilage and a defective cartilage. In this step, the cartilage tissue may be used in the form of a mixture with a carrier selected from among collagen, polyglycolic acid (PGA), polylactic acid, an alginate, polyethylene oxide, a fibrin adhesive, a polylactic acid-polyglycolic acid copolymer, a proteoglycan and a glucosaminoglycan. The chondrocytes obtained by the production method according to the present invention are practically usable as such without resort to a carrier.

#### A. Human chondrocytes

The method of producing chondrocytes according to the present invention can be applied to the culture of chondrocytes of any human cartilage tissue having perichondrium bonded thereto such as auricular cartilage, costal cartilage, articular cartilage, intervertebral cartilage or tracheal cartilage. In particular, it is suitable for culturing and proliferating chondrocytes of auricular cartilage.

The chondrocytes to be used in the production method according to the present invention can be obtained from a human cartilage tissue having perichondrium by publicly known methods. It is generally

preferable that an excised cartilage tissue is diced with a surgical knife or the like, treated with collagenase and then cultured and proliferated. For example, the process can be performed as follows.

1) A cartilage tissue is excised and disinfected by allowing to stand at about 4°C overnight together with an antibiotic (for example, penicillin or kanamycin) or an antifungal agent (for example, amphotericin B). Then, the cartilage tissue is diced with a surgical knife, etc.

2) The diced cartilage tissue is transferred into a medium containing type II collagenase and allowed to stand at about 4°C overnight. Next, it is shaken at 37°C for 4 hours.

3) The thus treated tissue is centrifuged and the obtained precipitate (chondrocytes·perichondrium cells) is employed in the culture.

By this method, 3 to  $5 \times 10^6$  chondrocytes can be obtained at the first generation of subculture from a human auricular cartilage tissue piece ( $1 \text{ cm}^2$ ). In the culture method according to the present invention, moreover, use can be made of a known growth factor, especially one capable of stimulating the proliferation of cartilage, appropriately selected form among FGF (for example, bFGF), IGF (for example, IGF-I), bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and combinations thereof.

#### B. Method of culturing human chondrocytes

To culture human chondrocytes, use can be made of publicly known media suitable for culturing chondrocytes. In addition to fetal bovine serum (FBS) or human serum and hydrocortisone, the media may optionally contain a proliferation factor such as human bFGF or human IGF-I (Cuevas et. al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 156, 611-618 (1988); and Froger-Gaillard et al., Endocrinol. 124, 2365-72). As an example of such a medium, DME(H) medium containing FBS (preferably about 10%), human bFGF (preferably



手続補正書  
(法第 11 条の規定による補正)

特許庁審査官 七条 里美殿

1 國際出願の表示 P C T / J P 2 0 0 4 / 0 0 5 0 7 1

2 出願人

氏 名 矢 永 博 子

YANAGA Hiroko

あて名 〒802-0044 日本国福岡県北九州市小倉北区熊本 3 丁目 16-1

アンピエント小倉912

Ambient Kokura 912, 16-1, Kumamoto 3-chome,

Kokurakita-ku, Kitakyusyu-shi,

Fukuoka 802-0044, Japan

国 籍 日本国 Japan

住 所 日本国 Japan

3 代理人

氏 名 (8273) 弁理士 成瀬 勝夫

NARUSE Katsuo



あて名 〒105-0003 日本国東京都港区西新橋 2 丁目 11 番 5 号

TKK 西新橋ビル 5 階

5th Floor, TKK Nishishinbashi Bldg., 11-5,

Nishi-shinbashi 2-chome, Minato-ku

Tokyo 105-0003 Japan

4. 補正の対象 明細書

## 5. 補正の内容

(1) 明細書第 6 頁 6~9 行の「この組織は、注射筒等に入れ、注射針を付け  
てから軟骨欠損部位に注入して鼻の変形、隆鼻、顔面骨変形、顔面骨  
欠損、頤形成、頭蓋骨変形、頭蓋部欠損、変形性関節症、小耳症、そ  
の他軟骨欠損を伴う疾患や軟骨欠損部の治療・修復に供することができ  
る。」から「変形性関節症」を削除し、「この組織は、注射筒等に  
入れ、注射針を付けてから軟骨欠損部位に注入して鼻の変形、隆鼻、  
顔面骨変形、顔面骨欠損、頤形成、頭蓋骨変形、頭蓋部欠損、小耳症、  
その他軟骨欠損を伴う疾患や軟骨欠損部の治療・修復に供することができ  
る。」に補正する。

(2) 明細書第 6 頁 19~22 行の「本発明の軟骨細胞の製法は、軟骨膜が付着  
した状態のヒト軟骨組織、例えば耳介軟骨、肋軟骨、関節軟骨、椎間  
軟骨および気管軟骨の軟骨細胞の培養に用いることができるが、特に  
耳介軟骨の軟骨細胞の培養・増殖に適している。」から「関節軟骨」  
を削除し、「本発明の軟骨細胞の製法は、軟骨膜が付着した状態のヒ  
ト軟骨組織、例えば耳介軟骨、肋軟骨、椎間軟骨および気管軟骨の軟  
骨細胞の培養に用いることができるが、特に耳介軟骨の軟骨細胞の培  
養・増殖に適している。」に補正する。

(3) 明細書第 7 頁 10 行の「次に、処理した組織を遠心して、この沈殿物を  
培養に供する。」を「次に、処理した組織を遠心して、この沈殿物  
(軟骨細胞・軟骨膜細胞) を培養に供する。」に補正する。

## 6. 添付書類の目録

(1) 明細書 第 6 頁  
(2) 明細書 第 7 頁

以上

この単層培養で増殖した細胞を用いて数回に渡り重層培養を行うことにより、ピンセット等の器具で取り扱える程度の物理的強度を有し、且つ生体に移植した時に分散・吸収されない組織を得ることができる。重層の播種回数は、所望する組織の大きさによって異なるが、一般的には3～4回が好ましい。

この組織は、注射筒等に入れ、注射針を付けてから軟骨欠損部位に注入して鼻の変形、隆鼻、顔面骨変形、顔面骨欠損、頤形成、頭蓋骨変形、頭蓋部欠損、小耳症、その他軟骨欠損を伴う疾患や軟骨欠損部の治療・修復に供することができる。この時に、この軟骨組織にキャリアーとしてコラーゲン、ポリグリコール酸(PGA ; polyglycolic acid)、ポリ乳酸(polylactic acid)、アルギン酸塩(Alginate)、ポリエチレンオキシド、フィブリン接着剤、ポリ乳酸一ポリグリコール酸共重合体、プロテオグリカン(proteoglycans)、グリコサミノグリカン(glucosaminoglycan)を混合して用いても良い。なお、本発明の製法により得られる軟骨細胞はキャリアー無しでも実用に供することが出来る。

#### A. ヒト軟骨細胞

本発明の軟骨細胞の製法は、軟骨膜が付着した状態のヒト軟骨組織、例えば耳介軟骨、肋軟骨、椎間軟骨および気管軟骨の軟骨細胞の培養に用いることができるが、特に耳介軟骨の軟骨細胞の培養・増殖に適している。

本発明の製法に供される軟骨細胞は、公知の方法により軟骨膜を付着させたヒト軟骨組織から得ることができる。一般的には摘

出した軟骨組織をメス等を用いて細切してコラゲナーゼで処理し、培養・増殖させることが好ましい。そのプロセスを具体的に例示すれば次のようである。

- 1) 摘出した軟骨組織を抗生物質（例えばペニシリン、カナマイシン）や抗真菌剤（例えばアムホテリシンB）にて一晩約4℃で静置して除菌し、次にメス等を用いて軟骨組織を細切する。
- 2) 細切した軟骨組織をII型コラゲナーゼを含む培地に移し、一晩約4℃で静置する。さらに、37℃にして4時間振とうする。
- 3) 次に、処理した組織を遠心して、この沈澱物（軟骨細胞・軟骨膜細胞）を培養に供する。

この方法により、1平方センチのヒト耳介軟骨組織から継代1代目で $3 \sim 5 \times 10^6$ 細胞個の軟骨細胞を得ることができる。また、本発明の培養方法において、公知の増殖因子、特に軟骨の増殖を刺激するもの、例えばFGF（例えばbFGF）、IGF（例えばIGF-1）および骨形成因子9(BMP9)から適宜選択し、或いは組合させて使用することができる。

#### B. ヒト軟骨細胞培養方法

ヒト軟骨細胞の培養は、軟骨細胞の培養に適した公知の培地を用いることができる。また、培地にはウシ胎仔血清(FBS)又はヒト血清、ヒドロコルチゾン(Hydrocortisone)の他に、ヒト bFGF、ヒト IGF-1 等の増殖因子を適宜添加する(Cuevas ら、Biochem. Biophys. Res. Commun. 156, 611-18, 1988 ; Froger-Gaillard 等、Endocrinol. 124, 2365-72)。そのような培地の例として、DME(H)培地に、FBS(好ましくは10%程度)、ヒト bFGF(好ましくは